

BEST AVAILABLE COPY

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 671 356

(21) N° d'enregistrement national : 91 00189

(51) Int Cl⁵ : C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 09.01.91.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) — FR
et INSTITUT PASTEUR — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.07.92 Bulletin 92/28.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : Kourilsky Philippe, Pannetier
Christophe et Cochet Madeleine.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

(54) Procédé de description des répertoires d'anticorps (AB) et des récepteurs des cellules T (TCR) du système
immunitaire d'un individu.

(57) La présente invention concerne un procédé de description des répertoires d'anticorps (Ab) et de récepteurs des cellules T (TcR) du système immunitaire d'un individu, caractérisé en ce que :

- à partir d'un prélèvement biologique, on effectue la transcription réverse des mARN qu'il contient,
- on effectue ensuite, sur le produit de transcription (ou directement sur l'ADN extrait de l'échantillon), des amplifications séparées par une méthode de type PCR pour chaque couple d'amorce V,C, V correspondant à un segment variable du répertoire en cause et C s'hybridant au segment constant du répertoire étudié,
- sur chacun de ces produits d'amplification on effectue, pour chaque segment J du répertoire marqué, une étape d'elongation utilisant comme amorce un oligonucléotide spécifique de ce segment J et le produit d'amplification comme matrice,
- pour chaque produit d'elongation correspondant à un triplet (V,C)J ainsi obtenu on fait apparaître la taille des différents produits d'elongation,
- la description des répertoires correspondant pour chaque élément du répertoire à un triplet VCJ et à la taille de l'élément.

FR 2 671 356 - A1



La présente invention concerne un procédé permettant la description du répertoire immunitaire d'un individu et, ainsi, la mise en évidence et/ou le suivi de certains états pathologiques.

Une caractéristique essentielle du système immunitaire est la 5 capacité de reconnaître spécifiquement un grand nombre d'antigènes. Chez les vertébrés, les lymphocytes T et B assurent principalement cette fonction de reconnaissance, au moyen d'au moins trois complexes moléculaires transmembranaires ; l'immunoglobuline pour les cellules B, et les deux récepteurs T pour les lymphocytes T : le récepteur $\alpha\beta$ et le récepteur $\gamma\delta$ qui 10 définissent ainsi deux sous-populations parmi l'ensemble des lymphocytes T (Wilson et al., 1988 ; Raulet, 1989).

A la formidable variété des antigènes à reconnaître, correspond une très grande diversité potentielle de ces trois types de récepteurs. En effet, ces trois complexes moléculaires, de structure voisine, 15 sont composés de deux (pour chacun des récepteurs T) ou quatre (pour les immunoglobulines) chaînes peptidiques dont les domaines NH₂-terminaux sont très variables. C'est l'existence d'une interaction forte entre un déterminant antigénique donné et le site constitué par ces domaines variables, qui 20 constitue la traduction à l'échelle moléculaire du phénomène de reconnaissance. C'est ainsi que les informations contenues dans le génome d'une souris lui permettent de produire potentiellement au moins 10^{11} immunoglobulines de région variable différente, 10^{15} récepteurs $\alpha\beta$ différents, et 10^{18} récepteurs $\gamma\delta$ différents.

Ainsi émerge la notion de répertoire : l'ensemble des régions 25 variables des immunoglobulines présentes à un instant donné dans un organisme constitue le répertoire actuel des immunoglobulines. De même, l'ensemble des régions variables des récepteurs $\gamma\delta$ pouvant être éventuellement produites par un génome de souris constitue le répertoire potentiel des lymphocytes $\gamma\delta$.

Le système immunitaire contient donc, en fait, trois 30 répertoires complexes, du fait que le répertoire des récepteurs T doit être subdivisé en répertoire des récepteurs $\alpha\beta$ et des récepteurs $\gamma\delta$.

Les mécanismes qui permettent de produire l'immense 35 diversité des récepteurs des lymphocytes T et B sont maintenant bien connus (Tonegawa, 1983). La région variable d'une immunoglobuline ou d'un

récepteur T est formée par les domaines NH₂-terminaux de deux chaînes peptidiques. Les gènes codant pour ces deux protéines sont le résultat de réarrangements somatiques qui juxtaposent un segment V, un ou deux segments D selon les chaînes, et un segment J. Le nombre de segments V, 5 D et J disponibles dans les différents loci fournit une première source de diversité dite diversité combinatoire (cf tableau 1). De plus, l'imprécision des jonctions entre deux de ces segments (jonctions V-D, D-D, D-J ou V-J) introduit une deuxième source de diversité dite diversité jonctionnelle, puisque d'une part, chacune des deux extrémités juxtaposées peut se trouver 10 amputée de quelques bases, et que d'autre part, peuvent être insérés des nucléotides au site de la jonction. Enfin, dans le cas des gènes codant pour les immunoglobulines, des mutations somatiques peuvent se produire dans le deuxième exon du gène réarrangé, ce qui constitue une troisième source de diversité.

15 Selon le type de récepteur $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ ou immunoglobuline, chacune de ces trois sources de diversité est une composante plus ou moins importante de la diversité totale. Ainsi, alors que le nombre de segments V, D et J disponibles est le plus faible dans le cas du récepteur $\gamma\delta$, l'étendue du répertoire de ce récepteur reste potentiellement très grande. Ceci 20 provient essentiellement du fait que le gène codant la chaîne δ peut comprendre zéro, un ou deux éléments D, qui peuvent de plus être lus dans les trois phases de lecture, alors que les chaînes V_H et β comptent un et un seul élément D. En fait, la diversité du répertoire des récepteurs $\gamma\delta$ peut 25 être décrite de la façon suivante : il semble qu'un faible nombre de segments V et J soit disponible, mais le nombre de segments V de la chaîne δ est encore mal connu et il existe une très grande diversité jonctionnelle potentielle qui se traduit par une variation importante de la longueur du deuxième exon du gène réarrangé, surtout dans le cas du gène codant pour la chaîne δ (Raulet, 1989).

30 La fonction des lymphocytes $T\alpha\beta$ est relativement bien connue : ils interviennent dans la cytolysé par les cellules tueuses, dans les réactions qui règlent la synthèse des anticorps et dans des phénomènes inflammatoires. La fonction des lymphocytes $T\gamma\delta$ est encore mal comprise : on admet en général qu'outre leur rôle probable dans l'ontogénie du 35

système immunitaire, les cellules T γ 5 participent à la surveillance immunitaire. Quant aux diverses fonctions des anticorps, elles sont relativement bien connues et ne seront pas rappelées ici.

Nul n'est aujourd'hui capable de décrire l'ensemble des anticorps et des récepteurs T (i.e. les répertoires des Ab et des TcR) exprimés à un moment donné dans un individu. Il s'agit d'une tâche formidable puisque chacun des répertoires comporte vraisemblablement des millions de molécules différentes. On ne dispose encore que d'un faible nombre de réactifs capables de reconnaître spécifiquement tel ou tel élément de tel répertoire. On peut certes opérer plus finement en déterminant la séquence d'un certain nombre de gènes exprimés. Toutefois, des considérations pratiques font qu'il n'est guère concevable d'analyser, en routine, plus d'une dizaine ou, peut-être, d'une centaine de gènes, et l'opération est coûteuse et très longue. En bref, on ne décrit, à l'heure actuelle, les répertoires d'anticorps et de récepteurs T qu'au moyen d'un petit nombre de paramètres. On ne dispose donc pas de méthodes qui permettent d'analyser rapidement et efficacement des situations physiologiques et pathologiques liées à l'état de ces répertoires. Par exemple, il est clair que ces répertoires varient au cours d'une immunisation volontaire (vaccin), ou au cours de l'infection par des microorganismes pathogènes, ou encore dans l'évolution de pathologies auto-immunes. Dans ce dernier cas, il y a de nombreuses raisons de penser que la prédisposition à ces maladies est le reflet d'une certaine composition des répertoires. Il est donc très probable qu'une bonne méthode d'analyse des répertoires aurait des retombées médicales, et pourraît fonder des techniques d'analyse médicale et de diagnostic.

Une méthode maintenant très utilisée dans le but d'étudier la diversité et la distribution des trois répertoires immunoglobulines, récepteurs α , β et γ , est celle de l'amplification par PCR (Polymerase 30 Chain Reaction). Cette technique consiste à amplifier l'ADN génomique ou l'ADN complémentaire avec une série de couples d'amorces spécifiques (V,C) ou (V,J) et le cas échéant, de cloner puis de séquencer les produits d'amplification obtenus (Takagaki et al., 1989) ; Asarnow et al., 1989). Cette méthode puissante n'est pas exempte d'artefacts. Sans même parler 35 des problèmes liés à la quantification, il semble par exemple hasardeux de

5 déduire de deux amplifications réalisées avec deux couples d'amorces différents, (V1, C) et (V2, C) par exemple, un usage préférentiel d'un segment par rapport à l'autre dans la population étudiée (Rajasekar et al., 1990). Dans l'état actuel de la technique, il est difficile de déterminer par cette méthode le taux d'usage des différents segments V. D'autre part, le clonage des produits d'amplification en vue de déterminer leur séquence peut également générer des artefacts. Par exemple, une certaine proportion de ces produits sont en fait des hétéroduplexes (si la population amplifiée est hétérogène) dont on ne peut prédire comment il seront "réparés" après 10 transformation de la bactérie (Abastado et al., 1984, 1987).

15 Un perfectionnement récent est l'amplification suivant la technique de la PCR ancrée, qui consiste à réaliser l'amplification d'une population hétérogène d'ADN complémentaires à l'aide d'un couple unique d'amorces, l'une s'hybridant dans la région constante C, l'autre avec une séquence identique ajoutée en 3' de tous les brins d'ADN complémentaires. On peut donc espérer que le rendement de l'amplification ne dépende pas 20 du segment V utilisé dans le réarrangement.

25 Récemment, une méthode assez sensible permettant d'évaluer le taux d'usage des différents segments V dans une population de transcrits hétérogènes a été développée (Okada et Weissman, 1989 ; Singer et al., 1990). Cette méthode précise et reproductible a l'avantage d'être simple conceptuellement donc d'introduire peu de biais. Cependant, elle ne permet 30 ni de définir simultanément l'usage V et l'usage J, ni de déterminer si le transcrit révélé est en phase.

35 Parallèlement à l'amplification à partir de populations polyclonales, une autre démarche largement utilisée a consisté à construire des banques d'hybridomes ou de lignées T clonales, puis de caractériser au niveau moléculaire les anticorps ou les récepteurs T exprimés. Cette méthode est évidemment difficile à mettre en oeuvre à grande échelle. Elle introduit des biais difficiles à évaluer, lors des étapes de fusion ou de clonage, mais est la seule technique actuelle permettant de déterminer simultanément la séquence des deux chaînes d'une récepteur T ou de déterminer un répertoire d'une spécificité connue.

Il faut noter que les méthodes citées plus haut caractérisent toutes le répertoire à partir de l'ARN messager et non pas de la protéine,

de sorte que tout contrôle post-transcriptionnel est méconnu. L'utilisation d'anticorps monoclonaux et de la cytofluorométrie en flux permet d'analyser le répertoire au niveau du récepteur même et donne simultanément de multiples renseignements sur le phénotype des cellules étudiées.

5 Cependant, cette méthode est assez peu sensible, et surtout, ne permet pas d'étudier dans le détail le répertoire puisqu'il est impossible, faute de réactifs, d'accéder à la diversité jonctionnelle du répertoire. Elle nécessite de plus de disposer d'une batterie importante d'anticorps monoclonaux bien caractérisés.

10 La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé permettant la description du répertoire immunitaire d'un individu, qui puisse être facilement automatisé, prenne en compte un très grand nombre de paramètres et soit dépourvu des biais des procédés décrits précédemment.

15 Plus précisément, la présente invention concerne un procédé de description des répertoires d'anticorps (Ab) et de récepteurs des cellules T (TcR) du système immunitaire d'un individu, caractérisé en ce que :

- à partir d'un prélèvement biologique, on effectue la transcription réverse des mARN qu'il contient,
- 20 - on effectue ensuite, sur le produit de transcription ou directement sur l'ADN extrait de l'échantillon, des amplifications séparées par une méthode de type PCR pour chaque couple d'amorce V,C, V correspondant à un segment variable du répertoire en cause et C s'hybridant au segment constant du répertoire étudié,
- 25 - sur chacun de ces produits d'amplification on effectue, pour chaque segment J du répertoire, une étape d'elongation utilisant comme amorce un oligonucléotide marqué spécifique de ce segment J et le produit d'amplification comme matrice,
- pour chaque produit d'elongation correspondant à un triplet (V,C)J ainsi obtenu on fait apparaître la taille des différents produits d'elongation, au nucléotide près, par les procédés généralement utilisés pour la détermination des séquences d'ADN,
- 30 - la description des répertoires correspondant, pour chaque élément du répertoire, à un triplet V,C,J et à la taille de l'élément.

Une alternative consiste à extraire l'ADN de l'échantillon biologique et à pratiquer l'amplification sur l'ADN dénaturé, en utilisant le fait que les réarrangements productifs rapprochent le segment variable de la région constante, de sorte que seuls les segments variables utilisés 5 servent efficacement dans l'amplification.

Le procédé selon l'invention peut être utilisé aussi bien pour décrire l'un des trois répertoires ou bien les trois ou seulement deux d'entre eux. Dans ce qui suit, on décrira particulièrement le répertoire $T\gamma\delta$ mais la même méthodologie est utilisable pour le répertoire $T\alpha\beta$ et les 10 immunoglobulines.

Par "description du répertoire" on entend désigner aussi bien un état sous forme de tableau, bi ou tridimensionnel, qu'une représentation graphique et/ou des reproductions de gel par exemple.

En effet, l'un des intérêts de la présente invention est de 15 pouvoir comparer ces répertoires, en particulier à des états de répertoire type pouvant être liés à des physiologies ou des pathologies déterminées ou bien de suivre l'évolution de ces répertoires dans l'apparition et/ou l'évolution de certaines maladies telles que certains cancers, maladies autoimmunes ou SIDA. Par exemple, au cours de la réaction immunitaire 20 qui survient dans au moins quelques types de cancers, la détection rapide des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), l'observation de leur évolution, ainsi que du reste du répertoire au cours d'un traitement par immunothérapie pourrait se révéler une approche intéressante. On peut envisager d'appliquer la puissance de la méthode à l'étude de l'évolution du 25 répertoire au cours du développement d'une maladie autoimmune. On sait en effet que dans nombre de maladies autoimmunes, les lymphocytes T tiennent une importance de premier plan. Si l'on devait, à la suite d'études réalisées dans les quelques modèles animaux disponibles, observer des 30 corrélations strictes entre certaines de ces pathologies et un état ou une suite d'états du répertoire mesurés selon la méthode présentée, il serait alors parfaitement envisageable de donner une valeur prédictive à cette méthode d'analyse, et par conséquent une valeur de diagnostic plus précoce que les tests actuellement disponibles. Ce procédé peut donc devenir un 35 outil d'investigation et d'analyse puissant pour l'étude et la surveillance du système immunitaire.

Les méthodologies mises en oeuvre dans ce procédé sont connues dans leurs principes.

5 Ainsi, dans le prélèvement du patient on préparera l'ARN (ou l'ADN) par des méthodes connues qui pourront dépendre de la nature du prélèvement (sang périphérique ou biopsie par exemple).

La synthèse d'ADN complémentaire par transcription réverse est connue, de même que le procédé permettant de ne transcrire que les mARN messagers présents dans cet ARN total, au moyen d'une amorce poly(T).

10 L'amplification peut être réalisée par une méthode de type PCR, c'est-a-dire par la méthode PCR ou par l'une de ses nombreuses variantes.

15 Le procédé est mis en oeuvre, de préférence, par PCR (polymerase chain reaction) et sans addition d'aucun traceur radioactif, coloré ou fluorescent. On amplifie l'ADN, pouvant provenir aussi bien d'une prise de sang que d'un autre prélèvement ou biopsie, toutefois le prélèvement initial doit contenir un nombre suffisamment élevé de cellules pour que les résultats ultérieurs soient statistiquement significatifs. L'amplification démarre par une étape de transcription reverse (ou à partir 20 de l'ADN extrait des cellules prélevées). Après quoi, on divise l'échantillon et on procède à autant de réactions d'amplification séparées qu'il y a de couples d'oligonucléotides (V,C).

25 On subdivise alors chacun des échantillons de façon à pratiquer, pour chacun d'entre eux, autant de réactions dites d'elongation ou de "run-off" qu'il y a de segments J. Pour effectuer ces réactions, on utilise des oligonucléotides spécifiques de ces segments J qui, cette fois, sont marqués, soit avec un traceur radioactif, soit, plus avantageusement, avec un fluorophore ou par d'autres méthodes. Dans la réaction de "run-off", la polymérase recopie jusqu'au bout les segments amplifiés à 30 partir de l'oligonucléotide J. Si ceux-ci sont hétérogènes en longueur, on obtient donc un ensemble de molécules marquées à leur extrémité J et dont on peut mesurer la taille avec précision.

35 Cette mesure de taille peut être faite sur des gels de séquence d'ADN conventionnels si l'on a effectué un marquage radioactif ou, avantageusement, avec un séquenceur automatique, notamment capable

de détecter les fluorophores. L'appareil est donc utilisé uniquement pour mesurer les longueurs et l'intensité des produits d'elongation. Bien entendu, puisqu'il existe quatre fluorophores commerciaux de "couleurs" différentes, on pourra, comme il est fait dans les determinations de séquence d'ADN, mais pour des raisons totalement différentes, mélanger les produits de quatre réactions différentes utilisant des fluorophores différents. Par exemple, il pourra être particulièrement utile de mélanger les produits de réactions homologues faites sur un échantillon témoin et marqués avec une couleur donnée, avec ceux de trois échantillons à étudier. De cette façon, on obtient une comparaison directe des échantillons au témoin, mais d'autres schémas expérimentaux sont possibles. Certains appareils commerciaux pratiquent une analyse des quatre couleurs dans 24 pistes simultanément (soit 96 échantillons). L'analyse prend quelques heures et les résultats sont informatisés.

15 Grâce à l'utilisation d'un séquenceur, on peut simplifier la lecture des autoradiogrammes dans la séquence conventionnelle qui est longue. Dans le cas précis décrit dans l'exemple, il faut lire chaque expérience, mémoriser et interpréter plus de 1 000 éléments. Dans le cas d'un séquenceur automatique, l'information est immédiatement mise en mémoire et l'utilisation des logiciels existants ainsi que d'un logiciel écrit dans le cadre de l'invention permet d'obtenir la matrice des résultats.

On notera que les problèmes pratiques sont encore plus considérables pour le répertoire $\alpha\beta$ de la souris où il est question d'analyser quelque 60 000 éléments. Le problème du répertoire β est totalement soluble selon la stratégie adoptée pour les répertoires γ et δ . Le problème du répertoire α est ardu (5 000 échantillons à analyser pour chaque répertoire) mais des stratégies simplificatrices peuvent être développées. Il en va de même pour les répertoires d'anticorps et les répertoires humains.

30 Parmi les appareils aisément adaptables, il faut citer le séquenceur modèle 373A commercialisé par la société Applied Biosystems et les modèles apparentés.

35 Grâce au logiciel élaboré dans le cadre de l'invention, les données sont organisées, soit dans une représentation à trois dimensions (éléments génétiques dans le plan, longueur dans la hauteur), soit dans un

tableau à deux dimensions. Cette représentation est préférable en ce qu'elle permet, dans un matrice de points, de figurer l'abondance du produit de réaction (par exemple, le point est plus ou moins foncé selon l'intensité de la bande détectée par le séquenceur) et ensuite de comparer aisément 5 deux matrices (deux répertoires différents, deux états du même répertoire, etc...)

Une amélioration possible consiste à introduire un quatrième paramètre permettant d'analyser encore plus finement le répertoire. Il faut rappeler que cette notion de résolution est capitale, si l'on veut pouvoir 10 analyser des évolutions dans le répertoire actuel. En effet, plus le nombre de paramètres de mesure est important, plus la résolution est grande, et plus les chances de pouvoir saisir des variations fines du répertoire sont importantes. Ce quatrième paramètre donne accès, comme le troisième, à la diversité jonctionnelle. Il s'agit d'appliquer aux produits de "run-off" une 15 méthode d'électrophorèse réalisée en gradient de température ou de tout autre facteur dénaturant, de sorte que les produits de même taille soient séparés selon leur plus ou moins grande homologie avec une sonde fixe (Riesner et al., 1989). C'est donc un accès indirect à la séquence des régions variables qui est recherché. Des expériences sont en cours en 20 utilisant comme sonde les gènes réarrangés dans des hybridomes.

Les exemples ci-après sont destinés à mettre en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

Sur les figures ci-annexées,

- la figure 1 représente une partie du répertoire $T\gamma\delta$ dans le thymus (T),
25 la rate (R) d'une souris Balb/c adulte et le placenta (P) d'une souris F1 (C3H x C57/B16),
- la figure 2 représente l'analyse, sur gel dénaturant, des produits d'elongation obtenus avec différentes amores $J\beta$ sur de l'ADN extrait de ganglions amplifié par PCR avec des amores spécifiques des 30 segments $V\beta$ et $C\beta$:

A et B : souris B10.A immunisées avec le cytochrome C de pigeon:

1 = non immunisées

2 = après immunisation primaire

3 = restimulation in vitro, après immunisation primaire ;

C : souris C3H immunisées par le cytochrome C de pigeon:

4, 5, 6 = trois souris différentes non immunisées

7 = restimulation in vitro après immunisation primaire d'un groupe de souris,

5 les chiffres indiqués à droite ou à gauche des figures correspondent à la taille (en nucléotides) des produits allongés obtenus pour une combinaison V -J productive.

Matériels et méthodes

Oligonucléotides

10 Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés sur un automate 381A DNA Synthesizer (Applied Biosystems). Le décrochage de la colonne et le déblocage des fonctions phosphates (protégées par un groupement bêta-cyanoéthyl) s'effectuent en injectant dans la colonne 1,5 ml d'ammoniaque 28 % à raison de 0,5 ml par 30 mn. L'éluat est incubé pendant 12 heures à 56°C afin de déprotéger les bases de l'oligonucléotide (élimination des groupements benzoyl et isobutyryl). Après lyophilisation, l'oligonucléotide est resuspendu dans de l'eau, à une concentration de 50 µM.

Souris, cellules

20 Souris : Toutes les souches utilisées (Balb/c, Balb/b, DBA/2, CB 20, SJL et C3H/He) proviennent de l'animalerie de l'Institut Pasteur. Lorsque des accouplements ont été réalisés, le premier jour de gestation, jour où le bouchon vaginal est détecté, est appelé jour 0.

25 Cellules : Les hybridomes utilisés (T15, T14, T16, T18) résultent de la fusion de thymocytes d'une souris C3H/He adulte avec le partenaire BW5147 $\alpha^- \beta^-$ (mutant du thymome BW5147 d'AKR, n'exprimant plus le récepteur $\alpha \beta$).

Préparation d'ARN

30 L'ARN de tissus et de cellules en culture a été préparé selon trois méthodes différentes.

Première méthode, utilisée pour préparer l'ARN de cellules en culture : les cellules sont centrifugées ; le culot obtenu est resuspendu dans 10 ml d'une solution $\text{NaCH}_3\text{COO}^- \text{NaCl}$ 10 mM pH 5, 1 % SDS. Après incubation 2 mn à 4°C, 10 ml d'une solution de phénol non tamponnée, à 65°C sont ajoutés. L'ensemble est agité fortement pendant 5 mn ; après centrifugation 10 mn à 3 000 rpm, la phase aqueuse est prélevée,

remélangée à un volume de chloroforme-alcool isoamylique. Après centrifugation, l'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité en ajoutant 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et deux volumes d'éthanol.

5 Deuxième méthode, dite méthode AGPC (Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform): utilisable aussi bien pour préparer l'ARN d'un culot de cellules ou d'un organe, cette méthode permet d'éviter dans une très large mesure la dégradation des acides ribonucléiques susceptible d'intervenir dès que les cellules sont lysées. Cependant, des traces d'ADN 10 subsistent dans la préparation, qui peuvent être gênantes dans certaines applications.

La troisième méthode élimine cette contamination par l'ADN en exploitant la différence de densité des acides ribo- et déoxyribonucléiques. La séparation de ces deux espèces est réalisée par ultracentrifugation du 15 lysat en présence d'un gradient discontinu de CsCl: l'ADN est retenu à l'interface du gradient, tandis que l'ARN, plus dense, précipite. Cette méthode permet donc de récupérer à la fois l'ARN et l'ADN d'un tissu ou d'un culot cellulaire. Brièvement, une solution 4M de guanidine thiocyanate est préparée, contenant 0,5 % de Na N-laurylsarcosine, 25 mM EDTA, 20 0,13 % d'anti-foam A. Le gradient de CsCl est composé de 3 ml d'une solution 5,7 M de CsCl, 25 mM de Na acétate pH 5,2, 10 mM EDTA, et de 0,7 ml d'une solution 2,4 M de CsCl, 25 mM de Na acétate pH 5,2, 10 mM EDTA. Le tissu est broyé dans 7 ml de la solution 4 M de guanidine thiocyanate à l'aide d'un homogénéiseur potter, le lysat obtenu est 25 centrifugé 10 mn à 8 000 tr/mn dans un rotor HB-4 pour éliminer les particules solides. Le surnageant est déposé délicatement sur le coussin de CsCl : l'ensemble est mis à centrifuger 24 heures dans un rotor SW 41 à 30 000 tr/mn à 20°C. La phase liquide est alors éliminée (on peut lors de cette étape récupérer l'ADN situé à l'interface) et le culot est resuspendu dans 30 500 µl d'eau et précipité à - 20°C en ajoutant 1 ml d'éthanol et 50 µl de Na acétate 3 M, pH 5,2.

Préparation d'ADN complémentaire

La synthèse de l'ADN complémentaire est réalisée à partir de l'ARN total préparé selon l'une des trois méthodes décrites plus haut. Le 35 tampon utilisé est le même que celui de l'étape d'amplification par PCR

(tampon Cetus). En effet, les différents tampons proposés ne se sont pas révélés d'une efficacité sensiblement supérieure (comparaison par mesure de l'incorporation de dGTP marqué au ^{32}P) ; par contre, la concentration en Mg^{2+} de ces tampons ne permet pas de réaliser l'amplification par PCR sans autre étape intermédiaire. L'oligonucléotide utilisé comme amorce de la polymérisation du brin d'ADN complémentaire est un 15-mer poly-dT. Brièvement, 10 µg d'ARN total, lorsque celui-ci provient d'un organe de souris adulte, ou l'ARN de 10^5 cellules provenant d'une culture ou d'un thymus fétal, sont mis à incuber 10 mn à 70°C dans 50 µl d'une solution 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,2, 1,5 mM MgCl_2 , 0,01 % gélatine, 0,1 mM EDTA, 5 µM pdT(15), 0,2 mM dNTP. Puis, après 5 mn sur la glace, 5 unités d'AMV RT (Proméga ou Boehringer) sont ajoutés, ainsi que 34 unités de RNasin (Pharmacia) ; le tout est incubé 1 h à 43°C, porté à 100°C pendant 5 mn.

15

Amplification par la technique PCR

Les amplifications ont été réalisées sur les automates Perkin Elmer Cetus et Prem, selon la technique décrite (Saiki et al., 1988).

Pour amplifier l'ADN complémentaire le protocole utilisé fut le suivant : 5 µl de la solution préparée précédemment sont amplifiés dans 50 ou 100 µl d'une solution 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,2, 0,01 % gélatine, 0,2 µM en chacun des deux oligonucléotides utilisés, 2 u par 100 µl de Taq Polymérase (Beckman), 200 µM en chacun des nucléotides dATP, dGTP, dCTP et dTTP. La concentration en ion Mg^{2+} utilisée varie de 2 à 2,5 mM. Le tout est recouvert de 50 µl d'huile minérale, chauffé 10 mn à 80°C, amplifié par 40 cycles (1 mn à 94°C, 1 mn à 60°C, 1 mn à 72°C) puis incubé 10 mn à 72°C.

30

Parmi les paramètres permettant de réduire le bruit de fond du procédé, il faut citer l'utilisation de concentrations optimales d'ions magnésium dans les étapes d'amplification ou d'elongation, ainsi on utilisera de préférence entre 1 et 3 mM d'ions magnésium.

Marquage d'amorces, elongation par "run-off"

35

Les amores J utilisées pour réaliser l'étape de "run-off" ont au préalable été radiomarquées par phosphorylation de l'extrémité 5' à l'aide d'un phosphate ^{32}P . Le protocole est le suivant : 100 pmoles de

l'oligonucléotide sont incubés dans 10 µl pendant 30 mn à 37°C dans le tampon d'amplification à une concentration de 2,5 mM en Mg²⁺, en présence de 40 µCi de ³²P- ATP (soit 12 pmoles) et de 3 unités de T4 polynucléotide kinase. L'enzyme est ensuite inactivée en portant le tout à 5 70°C pendant 10 mn.

10 L'elongation par "run-off" à partir des amorces J marquées est réalisée dans les conditions suivantes. 1 µl du mélange amplifié précédemment est dilué dans 10 µl d'une solution identique à celle qui a été utilisée pour l'amplification (tampon d'amplification avec la concentration optimale de Mg²⁺ (2 à 2,5 mM), 200 µM en chacun des dNTP, 0,2 u de Taq Polymérase), à laquelle on ajoute l'amorce J marquée à la concentration de 1 µM (l'amorce J est donc un excès d'au moins 5 par rapport aux autres amorces V et C apportées par le µl du mélange amplifié). La réaction de "run-off" consiste en 3 mn à 94°C, 1 mn à 60°C suivi de 15 mn à 72°C.

15 Electrophorèses

20 L'analyse des produits d'amplification et des séquences est réalisée par une électrophorèse sur gel de 400 µm d'épaisseur, de 6 % polyacrylamide (réticulation : 1 g de bisacrylamide pour 19 g d'acrylamide) dans le tampon TBE (Maniatis et al., 1982) en conditions de dénaturation (95 % formamide, 20 mM EDTA, bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %) et incubés 10 mn à 80°C. La migration est réalisée dans le tampon TBE sous un champ électrique de 4 000 Vm⁻¹, pendant 2 h ou 4 h pour l'analyse de séquence, et 5 à 6 h pour l'analyse de produits d'amplification.

Exemple 1 - Etude de la diversité génétique de la chaîne γ du récepteur T chez la souris

Principe de la méthode

25 Pour chaque chaîne variable (V α , V β , V γ ou V δ pour les récepteurs T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$), les oligonucléotides spécifiques sont synthétisés et permettent d'amplifier séparément les copies cADN des ARN messagers. Le tableau ci-après donne la liste des oligonucléotides utilisés dans l'analyse suivante. Les transcrits correspondants aux régions variables V γ 1, V γ 2... V γ 7 sont amplifiés séparément, de même que ceux correspondant à V δ 1, V δ 2... V δ 9. Pour chaque produit d'amplification, une réaction spécifique des segments J est réalisée. Finalement, on mesure la taille des produits sur un gel de séquence. Ceci permet de décomposer les ARN messagers selon la

longueur de la région variable (région N notamment) qui peut varier de 10 à 20 nucléotides environ. En outre, on peut repérer les ARN messagers qui sont hors-phase pour la traduction en protéine. En résumé, un échantillon est paramétré (1) pour l'emploi des chaînes V ; (2) pour l'emploi des segments J et (3) pour la taille.

La diversité génétique, pour les récepteurs $T\gamma\delta$ de la souris, provient du réassortiment de 15 éléments génétiques pour la chaîne γ du récepteur et de 11 éléments de la chaîne δ . Au cours de recombinaisons qui engendrent les gènes actifs de structure V-D-J-C, divers mécanismes opèrent aux jonctions de certains segments recombinés de sorte que la longueur du gène actif est variable dans des limites qui sont de 0 à 20 nucléotides environ pour les gènes $V\gamma-J\gamma-C\gamma$ et de 0 à 50 nucléotides environ pour les gènes $V\delta-J\delta-C\delta$.

Le répertoire du récepteur $T\gamma\delta$ a été paramétré par la détermination : - des segments V, J et C qui sont utilisés, - de la longueur du gène réarrangé.

On voit dans le tableau 1 que ceci représente plus d'un millier de mesures pour les récepteurs $T\gamma\delta$. Dans le cas des récepteurs $T\alpha\beta$, il s'agit de plus de 50 000 mesures.

20 - Procédé expérimental

Pour le répertoire des récepteurs $T\gamma\delta$ de la souris, sont synthétisés :

25

- 7 oligonucléotides spécifiques de chaînes $V\gamma$,
- 3 oligonucléotides spécifiques de chaînes $J\gamma$,
- 4 oligonucléotides spécifiques de chaînes $C\gamma$,
- 9 oligonucléotides spécifiques de chaînes $V\delta$,
- 2 oligonucléotides spécifiques de chaînes $J\delta$,
- 1 oligonucléotide spécifique de la chaîne $C\delta$.

30 Les méthodes de détermination des amorces sont connues, en particulier lorsqu'il existe de fortes homologies entre des séquences que l'on entend distinguer, par exemple $V\gamma$ 1, $V\gamma$ 2 et $V\gamma$ 3.

Le tableau 2 ci-annexé donne la liste des oligonucléotides utilisés.

35 Les résultats obtenus sont répertoriés à la figure 1 sans l'usage J.

Tableau 1

Immunoglobuline			Récepteur β (1)		Récepteur γ δ (2)		
	Chaîne V_H	Chaîne V_{γ}	Chaîne V_{δ}	Chaîne α	Chaîne β	Chaîne γ	Chaîne δ
Répertoires							
murins							
Segments V	250-1000	250	2	100	25	7	10
Segments D	12	0	0	0	2	0	2
Segments J	4 + 1	4 + 1	4	50	12	3	1
Régions C	8 isotypes	1	4	1	2	4	1
Div. totale (3)	10	11	10	15	2	10	18
Répertoires							
humains (4)							
Segments V	100-200	80	60	80	8 + 6	4	2
Segments D	4	0	0	2	0	2	3
Segments J	6 + 3	5	6	50	13	5	1
Régions C	10 isotypes	1	6	1	2	2	1

(1) Wilson et al. (1988)
 (2) Raulet (1989)
 (3) Davis and Bjorkman (1988)
 (4) Meindl et al. (1990).

Tableau 2

V γ 1:	AGTTTGAGTATCTAATATATGTCT
V γ 2:	ACGACOCTTAGGAGGGAAGC
V γ 3:	TIGAGTATCTAATATATGTGAG
V γ 2 et 3:	CGCAAAAAACAAATCAACAG
V γ 4:	TGICCTTGCAACOOCCTACOC
V γ 5:	TGIGCACTGGTACCAACTGA
V γ 6:	GGAATTCAAAAGAAAACATTGTCT
V γ 7:	AAGCTAGAGGGTCCCTCTGC
J γ 1:	CTGCAAATACCTTGTGAAAAA
J γ 2:	CTGCAAATACCTTGTGAAAG
J γ 4:	GAATTACTAOGAGCTTGTGTC
C γ 1:	TTTCAGCAACAGAAGGAAGG
C γ 2:	TCCAGGATAGTATTGOCATT
C γ 3:	GGAAATGTCCTGCATCAAGCT
C γ 4:	GCTTGGGAGAAAAGTCTGAG
pan-C γ :	CTTATGGAGATTGTTCAGC
V δ 1:	GGAATTAGAAGGCAACAATGAAAG
V δ 2:	GTCOCYGCAGATGCAAGCC
V δ 3:	TTCCCTGGCTATTGOCCTCTGAC
V δ 4:	CGCGCTCTGIGIGAACTTCC
V δ 5:	CAGATCCTTGCAAGTTCATCC
V δ 6:	TCAAGTCATCAGCCTTGTC
V δ 7-R ⁽²⁾ :	GAAAGCTTCAGTGCAAGAGTC
V δ 7-T:	CGCAGAGCTGCAGTGTAAGT
V δ 8:	GCTACAGCACCCCTGCACATC
J δ 1:	TOCACAGTCACCTGGGTTCC
J δ 2:	TOCACAAAGAGCTATGOC
C δ :	CGAATTGACAAATCTTCITG

(1) Les nomenclatures utilisées sont celle de Heilig & Tonegawa (1986) pour le locus γ et celle de Raulet (1989) pour le locus δ . Le choix d'une partie des oligonucléotides provient directement de Takagaki *et al.* (1989 b).

(2) V δ 7-R est l'oligonucléotide spécifique du segment variable V δ 7 référencé dans Raulet (1989); V δ 7-T est l'oligonucléotide spécifique du segment variable V δ 7 référencé dans Takagaki *et al.* (1989).

Exemple 2 - Analyse de la diversité génétique du récepteur T $\alpha\beta$

La diversité génétique de la chaîne β du récepteur T sur des ganglions lymphatiques de souris B10.A, après immunisation par le cytochrome C de pigeon constitue un système de référence bien documenté.

5 En particulier, d'après les travaux publiés, on sait que la chaîne β de 75 à 80% des clones isolés après immunisation et restimulation *in vitro* par l'antigène, est composée du réarrangement $V\beta 3-J\beta 1.2-C\beta$.

Un échantillon d'ARN messager provenant de ganglions lymphatiques drainant de souris immunisées ou non, a été transformé en 10 cADN. Celui-ci a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec un couple d'oligonucléotides situés d'une part dans l'une des régions variables $V\beta$ et, d'autre part, dans la région constante. Cette opération a été répétée pour chaque région $V\beta$ (au nombre d'une vingtaine). A la suite de quoi, chaque réaction d'amplification, divisée en 12 échantillons (un pour 15 chaque $J\beta$), a servi de matrice pour un cycle d'elongation avec l'un des 12 $J\beta$ radiomarqué.

La figure 2 jointe illustre une partie des résultats obtenus pour les couples $V\beta 1-V\beta 3$ et $V\beta 16-C\beta$, réanalysés avec quatre $J\beta$ différents dont $J\beta 1.2$, sur des souris B10.A (H-2a) dans deux expériences 20 indépendantes (Figures A et B). Dans la figure A, pour le couple $V\beta 3-J\beta 1.2$, on voit apparaître une bande majoritaire dans les cellules T des ganglions restimulés *in vitro* par le cytochrome C de pigeons (figure A, canal 3). La taille des fragments constituant cette bande est en accord avec les résultats attendus (115 nucléotides pour $V\beta 3-J\beta 1.2$). Ces résultats sont 25 reproductibles d'une expérience à l'autre (figure B) et, de plus, indiquent que la prépondérance du réarrangement $V\beta 3-J\beta 1.2$ est déjà détectable après la première immunisation (figure B, $J\beta 1.2$, canal 2).

Il n'est pas exclu de pouvoir faire ce type d'analyse sur une 30 même souris de manière à éviter le problème des variations minimes existant d'une souris à l'autre, ainsi que l'illustre la figure C (canaux 4 à 6).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABASTADO et al. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5792-5796
5 ABASTADO et al. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6496-6500
ASARNOW et al. (1989). Nature 341, 60-62
DAVIS and BJORKMAN (1988). Nature 334, 395-402
MANIATIS et al. (1982). Molecular Cloning: Laboratory Manual. Cold Spring
10 MEINDL et al. (1990). Eur. J. Immunol. 20, 1855-1863
OKADA et WEISSMAN (1989). J. Exp. Med. 169, 1703-1719
RAJASEKAR et al. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1767-1771
15 RAULET (1989). Ann. Rev. Immunol. 7, 175-207
RIESNER et al. (1989). Electrophoresis 10, 377-389
SAIKI et al. (1988). Science 239, 487-491
SINGER et al. (1990). EMBO J. (in press)
20 TAKAGAKI et al. (1989). Nature 339, 712-714
TONEGAWA (1983). Nature 302, 575-581
WILSON et al. (1988). Immunological Reviews 101, 149-172

25

30

35

REVENDICATIONS

1) Procédé de description des répertoires d'anticorps (Ab) et de récepteurs des cellules T (TcR) du système immunitaire d'un individu, 5 caractérisé en ce que :

- à partir d'un prélèvement biologique, on effectue la transcription réverse des mARN qu'il contient,
- on effectue ensuite, sur le produit de transcription (ou directement sur l'ADN extrait de l'échantillon), des amplifications séparées par une 10 méthode de type PCR pour chaque couple d'amorce V,C, V correspondant à un segment variable du répertoire en cause et C s'hybridant au segment constant du répertoire étudié,
- sur chacun de ces produits d'amplification on effectue, pour chaque segment J du répertoire marqué, une étape d'elongation utilisant 15 comme amorce un oligonucléotide spécifique de ce segment J et le produit d'amplification comme matrice,
- pour chaque produit d'elongation correspondant à un triplet (V,C)J ainsi obtenu on fait apparaître la taille des différents produits d'elongation,
- la description des répertoires correspondant pour chaque élément du 20 répertoire à un triplet VCJ et à la taille de l'élément.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait apparaître les tailles des produits d'elongation par électrophorèse du mélange d'elongation et mise en évidence du marqueur.

3) Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en 25 ce que le marquage est radioactif, colorimétrique ou fluorescent.

4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les étapes sont effectuées en présence de 1 à 3 mM d'ion Mg^{2+} .

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on mesure l'intensité de chaque signal de taille moléculaire afin 30 d'obtenir une mesure quantitative de l'importance de la séquence correspondante.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'intensité de chaque signal est évaluée par rapport à un étalon interne.

7) Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les produits de même taille moléculaire sont séparés, en fonction de leur plus ou moins grande affinité pour une sonde fixe.

5 8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on effectue cette étape en électrophorèse à gradient de température ou de tout autre agent dénaturant.

9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que pour faire apparaître et décrire les tailles des produits d'elongation on utilise un appareil de séquençage automatique.

10

15

20

25

30

35

115

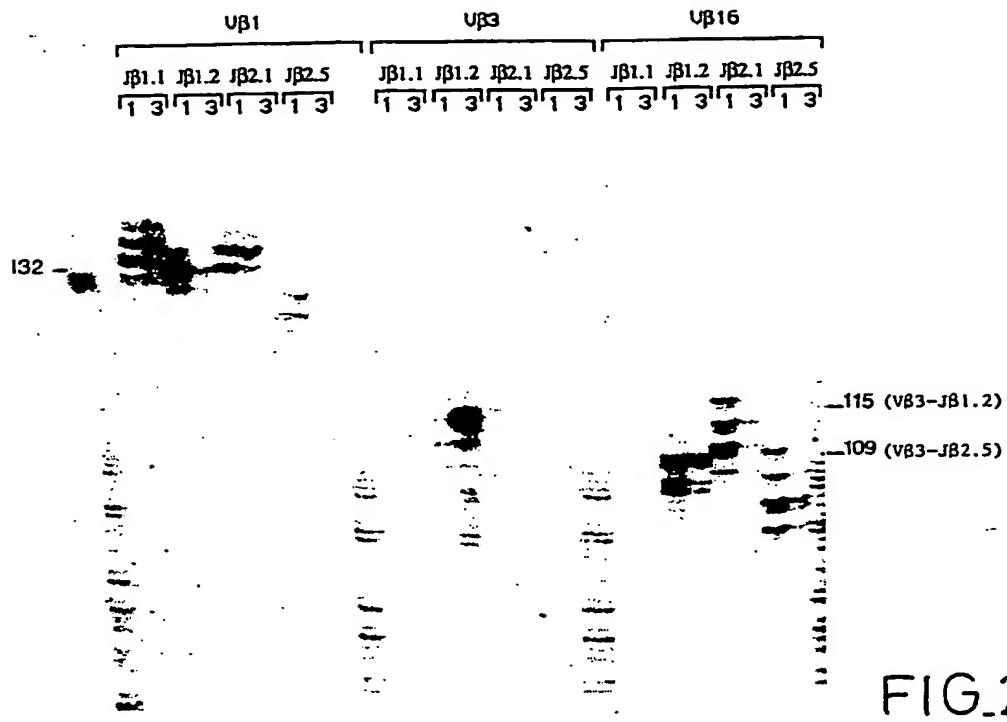


FIG. 2A

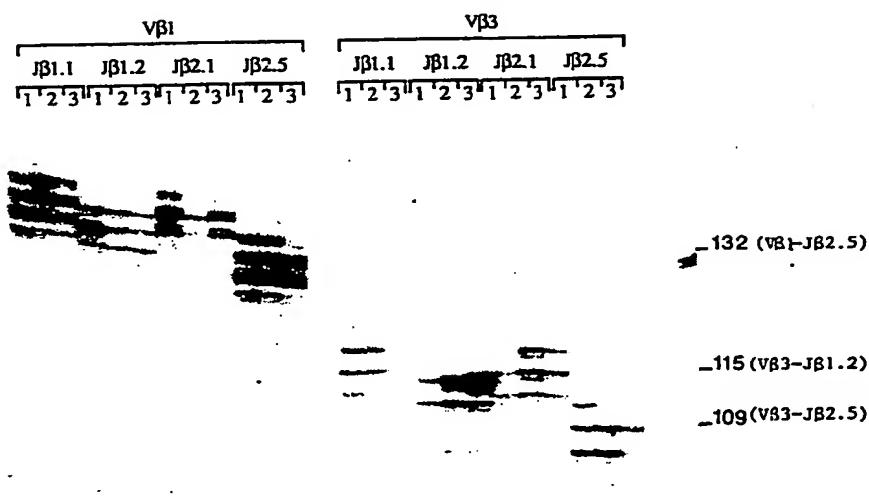
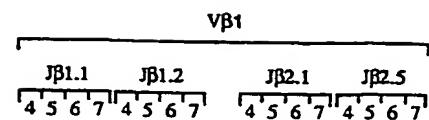


FIG. 2B

2 / 2

132 (v β 1-J β 2.5)FIG. 2C

V γ 2-Cy	V γ 4-Cy	V γ 5-Cy	V γ 6-Cy	V γ 7-Cy	V δ 1-C δ	V δ 3-C δ	V δ 4-C δ	V δ 5-C δ	V δ 6-C δ	V δ 7 _(T) -C δ
T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P	T R P



FIG. 1 : Répertoire T γ δ dans le thymus (T), la rate (R) d'une souris Balb/c adulte et le placenta (P) d'une souris F1 (C3H x C57/Bl6)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	NATURE, vol. 341, 7 septembre 1989, pages 60-62; D.M. ASARNOW et al.: "Distinct antigen receptor repertoires of two classes of murine epithelium-associated T cells" * En entier * ---	1-3
A	CHEMICAL ABSTRACT, vol. 111, 1989, page 176, abstract no. 147822p, Columbus, Ohio, US; M.E. ROTH et al.: "Analysis of T cell receptor transcripts using the polymerase chain reaction", & BIOTECHNIQUES 1989, 7(7), 746-8, 750, 752-4 * En entier * ---	1
A	WO-A-9 004 648 (MORLEY et al.) ---	
D, A	NATURE, vol. 339, 29 juin 1989, pages 712-714; Y. TAKAGAKI et al.: "Diversity of gammadelta T-cell receptors on murine intestinal intra-epithelial lymphocytes" -----	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) C 12 Q
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
23-09-1991		MOLINA GALAN E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.